

虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的高分辨筛选研究*陈文龙¹, 何健², 陶柒琪¹, 陈智超¹, 周灵佳¹, 陈芝蓄¹, 江正瑾^{1**}, 张婷婷^{1**}

(1. 暨南大学药学院 药物分析研究中心, 广州 510632; 2. 华润三九医药股份有限公司, 深圳 518110)

摘要 目的: 研究中药虎杖通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性发挥降糖功效的作用物质基础。**方法:** 整合高效液相色谱系统、微流分收集装置、活性检测通道和高分辨质谱仪 4 大模块, 搭建高通量活性轮廓分析平台; 并引入制备液相色谱对虎杖提取液进行分段富集, 通过优化色谱分离条件、微流分收集参数和多孔板中的酶活性检测方法等, 实现虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的快速筛选。**结果:** 从虎杖中筛出 28 个 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 其中儿茶素-3-O-没食子酰基和原花青素 B₂-3"-O-没食子酸酯的抑制活性 IC₅₀ 达到了 $(9.49 \pm 1.93) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(69.94 \pm 8.14) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论:** 本研究实现了中药中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的高通量与高分辨筛选, 为阐明虎杖降糖的活性物质基础和作用机制提供了有力工具。

关键词: 虎杖; 活性轮廓分析平台; 糖尿病; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 活性成分筛选; 作用物质基础

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)01-81-11

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0404

High-resolution screening of α -glucosidase inhibitors from *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix**CHEN Wen-long¹, HE Jian², TAO Qi-qi¹, CHEN Zhi-chao¹, ZHOU Ling-jia¹,
CHEN Zhi-xu¹, JIANG Zheng-jin^{1**}, ZHANG Ting-ting^{1**}

(1. Institute of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China)

Abstract Objective: To study the bioactive components of the hypoglycemic effect of the traditional Chinese medicine *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix* through its ability to inhibit α -glucosidase activity. **Methods:** Four modules: high-performance liquid chromatography system, the nanofraction collector, the channel of bioassay and high-resolution mass spectrometry were integrated to build a high-throughput bioassay profiling analysis platform. The preparative liquid chromatography was introduced to apply segmented enrichment to the extract of *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix*, and the rapid screening of α -glucosidase inhibitors from *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix* was realized by optimizing the chromatographic separation conditions, microfluidic fractionation

* 广东省大学生创新创业训练计划支持项目(S202310559152)

** 通信作者 江正瑾 Tel: 13928781219; E-mail: jzjackson@hotmail.com

张婷婷 Tel: 15918704550; E-mail: sunrat_115@163.com

第一作者 陈文龙 Tel: 15521608197; E-mail: 3421967241@qq.com

何健 Tel: (0755) 83360999-395012; E-mail: heni@999.com.cn

collection parameters and bioassaying of enzyme activity in multi-well plates. **Results:** 28 α -glucosidase inhibitors were identified from *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix*. The inhibitory activities of catechin-3-*O*-galloyl and procyanidin B₂-3"-*O*-gallate were determined with the IC₅₀ values of $(9.49 \pm 1.93) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(69.94 \pm 8.14) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This study has enabled high-throughput and high-resolution screening of α -glucosidase inhibitors in traditional Chinese medicine, providing a valuable tool for elucidating the active components and mechanisms of *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix* to lower hyperglycemia.

Keywords: *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix*; bioassay profiling analysis platform; diabetes; α -glucosidase inhibitors; screening of bioactive components; bioactive components

糖尿病 (diabetes) 是以高血糖为特征且存在多种并发症的一组代谢性疾病^[1], 发病率呈上升趋势, 且面临“人数多, 血糖达标率低, 并发症多”的现状^[2]。目前已发现多种基于不同作用机制的糖尿病治疗靶点, 其中 α -葡萄糖苷酶是小肠内参与糖苷水解的关键酶, 药物抑制其活性可发挥良好的降糖作用, 因此被视作糖尿病治疗的重要靶点^[3]。然而, 临床常用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂均具有明显副作用, 如阿卡波糖易引发胃肠道反应、肝功能损伤、高钾血症等; 伏格列波糖易诱发低血糖、消化不良、鼻衄、咽炎等^[4-5], 严重影响了糖尿病人的治疗依从性和生活质量。因此, 亟需寻找新型有效且副作用低的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 扩大糖尿病治疗药物的选择范围。

糖尿病, 中医典籍常称之为消渴症, 《本草纲目》记载“用虎杖、海浮石 (烧过)、乌贼骨、丹砂, 等分为末, 渴时, 以麦门冬汤冲服二钱”, 表明虎杖自古就是消渴症治疗的要药, 现代临床常用的含虎杖复方——养阴降糖片也具有确切的降糖功效^[6]。药理学研究表明, 虎杖提取物通过抑制人体内 α -葡萄糖苷酶的活性产生降糖作用^[7-8], 但药效物质基础尚不明确。如能建立一种靶向 α -葡萄糖苷酶, 且适用于中药复杂成分的抑制剂识别和筛选方法, 对虎杖药效物质基础的阐明和新型降糖药的研发将具有重大现实意义。

传统的活性成分筛选方法主要基于“活性追踪分离策略 (activity-guided fractionation, AGF)”, 以整体活性为导向, 需经过反复提取分离才能获得目标单体化合物, 其化学分析和活性评价无法同步, 分离通量低, 周期长, 成本高且痕量活性成分易丢失。随着现代分析技术的发展, 基于亲和作用的筛选方法应运而生^[9]。超滤质谱联用技术、磁珠配体垂钓技术等操作简便, 但因非特异性吸附易造成假阳性结果, 且无法直接反映其生物活性^[10]; 细胞膜色谱是将表面含

有众多受体的细胞膜固定交联在载体上作为色谱系统固定相来筛选目标化合物, 为保证固定相的生物活性, 对流动相中水相的比例有较高的要求, 限制了可应用的天然产物分子种类^[11], 且对复杂体系中特定极性成分不一定适用^[12]。

针对上述筛选方法的不足, 有研究者开发了高通量活性轮廓分析平台^[13]。该平台集色谱分离、质谱结构分析与生物活性评价三大模块于一体, 复杂样品经色谱分离后被分流, 1/3 进入质谱获取结构信息, 2/3 经自动化高通量微流分收集后进入生物活性分析通道获得活性轮廓数据, 实现不同流分的色谱分离信息、质谱结构信息和生物活性信息的对应整合, 大幅度提高了筛选效率和准确性。目前该平台已成功应用于天然产物中凝血酶抑制剂^[13]、脂肪酶抑制剂^[14]、神经氨酸酶抑制剂^[15]和胰蛋白酶抑制剂^[16]等的快速筛选, 在创新药物发现和作用机制研究中展现了巨大的潜力和推广价值。

本研究首次将高通量活性轮廓分析平台应用于虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选, 并引入制备液相色谱对复杂成分进行分段富集, 通过提高分辨率实现共洗脱成分的准确指认, 最终获得并鉴定了 28 个 α -葡萄糖苷酶抑制剂。高通量、高分辨活性轮廓分析平台的成功应用为中药等复杂体系中抗糖尿病活性成分的高效发现提供了有力的工具, 也为阐明中药作用机制的科学内涵提供了强大的技术和数据支持。

1 材料

1.1 样品与试剂

虎杖购自北京同仁堂药店, 经暨南大学药学院张婷婷副教授鉴定为蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) 的干燥根和根茎, 样品标本保存于暨南大学药学院药物分析研究中心 (标本号 150A)。

α -葡萄糖苷酶 ($14 \text{ units} \cdot \text{mg}^{-1}$), 西格玛-奥德

里奇试剂有限公司; 4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG), 上海麦克林生化科技有限公司; 无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠, 阿拉丁化学试剂有限公司; 牛血清白蛋白(BSA), 西格玛-奥德里奇试剂有限公司; 二甲基亚砜(DMSO), 阿拉丁化学试剂有限公司; 甲醇(色谱级), 默克生命科学上海有限公司; 甲酸(色谱级), 阿拉丁化学试剂有限公司; 超纯水, 厦门锐思捷水纯化技术有限公司; 蒸馏水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 磷酸盐缓冲液(pH 6.8), 由 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水磷酸氢二钠溶液与 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水磷酸二氢钠溶液以 49 : 51 混合配制。

没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)(批号 J1929052, 含量 $\geq 98.5\%$)、阿卡波糖(批号 Y0000500, 含量 $\geq 98.5\%$)、阿卡波糖水合物(批号 A832179, 含量 $\geq 95\%$)、米格列醇(批号 B25416, 含量 $\geq 98.5\%$)、阿拉丁化学试剂有限公司; 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-葡萄糖苷(批号 B21757, 含量 $\geq 98\%$)、上海源叶生物科技有限公司; 儿茶素-3-O-没食子酰基(批号 C22135E93, 含量 $\geq 98\%$)、上海吉至生化科技有限公司; 原花青素 B2-3''-O-没食子酸酯(批号 FNZ672, 含量 $\geq 98\%$)、广州市华豫贸易有限公司; 根皮苷(批号 S31392, 含量 $\geq 98.5\%$)、上海源叶生物科技有限公司; 虎杖苷(批号 S2390, 含量 $\geq 98.5\%$)、上海吉至生化科技有限公司。

1.2 仪器

BSA223S 型千分之一电子天平(赛多利斯公司), R-1001VN 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司), LC20AD 液相色谱系统(岛津公司), CTC HTS PAL 自动进样系统(思特斯分析仪器有限公司), X500R Q-TOF-MS 高分辨质谱(SCIEX 公司), 江山丰顺 XHDZF-系列真空干燥箱(上海霄汉实业发展有限公司), PB-10 pH 仪(赛多利斯公司), PerkinElmer EnVision[®] 2105 多模式酶标仪(珀

金埃尔默公司), 0.22 μm 滤膜(博纳艾杰尔科技有限公司), KQ2200D 超声仪(昆山舒美超声仪器有限公司), 药材粉碎机(上海丰行筛网制造公司), Diamonsil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱(北京迪科马科技有限公司), 3701 型 384 孔板(Corning 公司), Echo 550 纳升移液系统(Labcyte 公司)。

2 方法与结果

2.1 虎杖提取溶液的制备

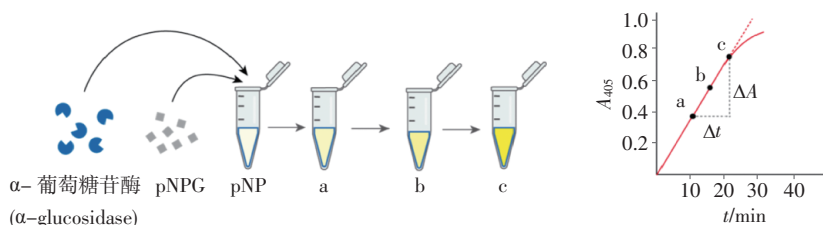
取虎杖饮片磨粉, 过 4 号筛, 称取粉末 5.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 95% 的乙醇溶液 150 mL, 浸泡 12 h, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下超声(40 kHz, 360 W) 提取 2 次, 每次 30 min。合并提取液, 旋转蒸发去除溶剂, 得到虎杖总提物。加入超纯水 150 mL 溶解总提物, 依次使用乙酸乙酯和正丁醇各 150 mL 对总提物水溶液进行分段萃取, 每种溶剂萃取 3 次, 合并后旋转蒸发去除溶剂, 得到乙酸乙酯层、正丁醇层和水层浸膏, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

2.2 α -葡萄糖苷酶活性检测方法的建立

pNPG 为 α -葡萄糖苷酶促反应的底物, 被酶水解后可释放出黄色的产物对硝基苯酚(pNP), 并在 405 nm 处产生吸收, 吸收度(A) 与产物浓度成正比。酶促反应速率即单位时间内产物的生成量, 可用产物吸收度在单位时间内的变化量动力学曲线斜率(k) 表示(见公式 1)。

$$k = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad \text{公式 1}$$

以磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 为溶剂制备 α -葡萄糖苷酶溶液($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和底物 pNPG 溶液($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。依次向 384 微孔板各孔中分别加入 α -葡萄糖苷酶溶液 25 μL 和 pNPG 溶液 25 μL , 振荡混匀后, 使用酶标仪在 405 nm 处对微孔板中反应体系溶液进行吸收度测定和动力学监测, 获得表征酶促反应速率的 k (图 1)。



a, b, c 分别为黄色产物对硝基苯酚的浓度随时间增加而呈线性增长的 3 个不同反应阶段 [a, b, c are three different reaction stages in which the concentration of the yellow product *p*-nitrophenol increases linearly with time]

图 1 α -葡萄糖苷酶酶促反应动力学曲线示意图

Fig. 1 The curve of kinetics of α -glucosidase enzyme-catalyzed reaction

2.3 虎杖提取物活性测试

称取“2.1”中得到的虎杖总提物乙酸乙酯层、正丁醇层和水层浸膏各 5 mg, 分别溶于 DMSO 100 μL 中。用 DMSO 稀释获得成梯度浓度 (50、16.67、5.56、1.85、0.617、0.206、0.069、0.023 和 0.007 6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的不同部位提取物溶液, 分别移取不同部位的梯度浓度溶液 500 nL, 加入 384 孔板对应的微孔中, 再分别加入含 BSA 的 α -葡萄糖苷酶溶液 25 μL , 每个浓度重复 3 次, 作为实验组; 向 3 个空白微孔中加入 BSA 溶液 25 μL , 作为空白对照组; 向 3 个空白微孔中加入含 BSA 的 α -葡萄糖苷酶溶液 25 μL , 作为阴性对照组。最后向以上所有微孔中加入 pNPG 溶液 25 μL 。

根据“2.2”的活性检测方法对加入溶液的微孔进行吸收度测定, 获得 k , 并采用公式 2 计算抑制率 (%) :

$$\text{抑制率} = \frac{k_{\text{空白}} - k_{\text{实验}}}{k_{\text{空白}}} \quad \text{公式 2}$$

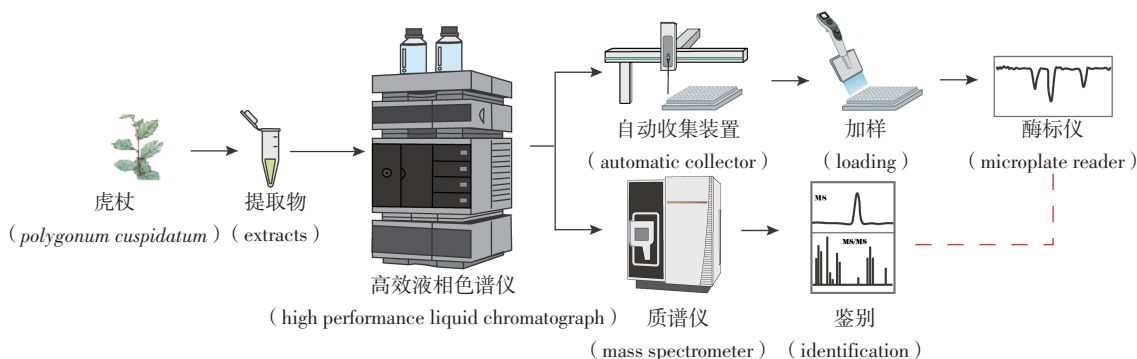


图 2 高分辨活性轮廓分析平台示意图

Fig. 2 High-resolution bioassay profiling analysis platform

2.5 活性评价谱图的建立

如图 3 所示, 通过微流分收集和酶促反应, 将 384 微孔板各孔动力学曲线的斜率值按编号排列, 算出斜率的中位数, 并将所有斜率除以该中位数, 即对所有增长曲线的斜率进行标准化, 便于多次实验结果间平行比较。

应用 Origin 软件按编号顺序将标准化斜率数据绘制成活性评价谱图, 横坐标为该孔所对应的微流分收集时间, 纵坐标为该孔经计算得到的标准化斜率 (图 3)。具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的成分会使动力学增长曲线的斜率变缓, 在活性谱图中以倒峰的形式出现 (图 3)。通过综合比对倒峰对应成分的色谱、

公式 2 中, $k_{\text{实验}}$ 表示实验组的酶动力学增长曲线斜率, $k_{\text{空白}}$ 表示空白对照组的酶动力学增长曲线斜率。

2.4 高分辨活性轮廓分析平台的构建

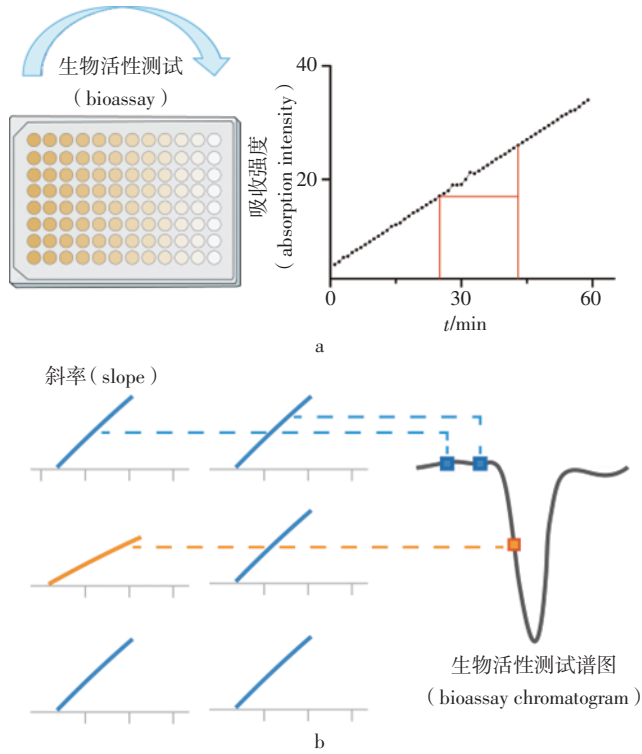
高分辨活性轮廓分析平台主要由高效液相色谱系统、微流分收集装置和高分辨质谱仪三大模块组成。如图 2 所示, 待测样品由进样器进入液相色谱系统完成色谱分离, 到达三通分流入口, 入口处 Peek 管的长度差异可有效调节通路分流和管路分压。入口处 1/3 的流分经过 DAD 信号检测器和高分辨质谱, 分别采集不同流分的色谱信号和质谱信号; 另外 2/3 的流分由微流分收集装置分段精准收集于 384 孔板中。微流分收集装置由 CTC HTS PAL 自动进样系统构建, 通过在电脑软件上设定自动进样器的机械臂位置参数和收集频率, 点样器可在 384 孔板上精准平行移动和停留, 从而实现对流分的精密定量收集。最后应用真空干燥箱对收集得到的微流分进行干燥, 再向干燥后的样品微孔中加入酶反应试剂, 在酶标仪中完成活性检测和活性谱图的构建。

质谱信息, 即可获得 α -葡萄糖苷酶抑制剂的具体结构特征。

2.6 虎杖乙酸乙酯部位活性评价

通过对虎杖提取物不同部位的 α -葡萄糖苷酶半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 的测定, 其乙酸乙酯部位浸膏溶液 (8、12 和 16 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 5% DMSO、40% 甲醇水溶液溶解) 表现出最优的抑制活性, 所以选择虎杖的乙酸乙酯部位进行高分辨活性轮廓分析。根据前期研究结果^[17], 采用 Diamonsil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温箱温度为室温, 以水 (含 0.1% 甲酸) (A) - 甲醇 (含 0.1% 甲酸) (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~10 min,

40%B → 45%B; 10~12 min, 45%B; 12~15 min, 45%B → 50%B; 15~20 min, 50%B; 20~35 min, 50%B → 65%B; 35~40 min, 65%B; 40~41 min, 65%B → 98%B; 41~55 min, 98%B; 55~60 min, 98%B → 40%B), 进样体积 20 μL, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm, 单孔收集时长 10 s。



a. 生物活性测试数据采集示意图 (diagram for data collection from bioassay)
b. 活性负峰构建示意图 (diagram of construction of negative peaks with bioactivity)

图3 生物活性谱获取流程图

Fig. 3 Flowchart for obtaining the bioassay chromatogram

2.7 制备液相色谱的引入

针对色谱图共洗脱成分造成活性负峰难以准确指认的问题,引入制备液相色谱对虎杖提取物进行半制备,提高低丰度高活性成分的分辨率。用适量甲醇溶解虎杖提取物制成 40 mg · mL⁻¹ 的浸膏溶液,进行半制备型高效液相色谱分离。根据前期研究结果^[17],采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,柱温箱温度为室温,以水(含 0.1% 甲酸)(A)-甲醇(含 0.1% 甲酸)(B)为流动相,梯度洗脱(0~20 min, 25%B; 20~25 min, 25%B → 30%B; 25~30 min, 30%B; 30~45 min, 30%B → 40%B; 45~55 min, 40%B; 55~70 min, 40%B → 45%B; 70~80 min, 45%B → 50%B; 80~85 min, 50%B),进样体

积 200 μL, 流速 3 mL · min⁻¹, 检测波长 280 nm。根据活性谱图结果收集保留时间在 0~16 min 的成分流出液,旋转蒸发去除溶剂后称重备用。

质谱条件: Q TOF MS/MS 分析以负离子模式进行,离子源温度为 550 °C; Curtain Gas 压力为 0.206 85 MPa; 离子源气体 1 为 0.379 225 MPa; 离子源气体 2 为 0.344 75 MPa; 离子喷射电压为 -4.5 kV; TOF MS 扫描的质量范围为 50~1 500, 扫描时间间隔为 0.15 s, 碰撞能量为 -10 eV (碰撞能量分布为 ± 0 eV); TOF MS/MS 扫描的质量范围为 50~1 500, 扫描时间间隔为 0.05 s, 碰撞能量为 -40 eV (碰撞能量分布为 ± 15 eV)。

2.8 虎杖提取物活性测试

取虎杖各提取部位按“2.6”项下方法测定 α-葡萄糖苷酶抑制活性,结果如表 1 所示。虎杖各提取部位对 α-葡萄糖苷酶均具有抑制作用,其中以乙酸乙酯部位抑制活性最高,故本实验选用乙酸乙酯部位提取物进行后续测试。

表 1 虎杖各提取部位活性比较

Tab. 1 Comparison of the activity of each extract of *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix*

样品 (sample)	IC ₅₀
水提取物 (water extract)	(129.25 ± 8.08) μg · mL ⁻¹
正丁醇提取物 (n-butanol extract)	>1 mg · mL ⁻¹
乙酸乙酯提取物 (ethyl acetate extract)	(13.76 ± 0.27) μg · mL ⁻¹

2.9 虎杖乙酸乙酯部位活性评价

2.9.1 活性负峰的指认 将反应酶促动力的吸收度变化曲线按照公式 2 计算得到图 4 中倒峰,再与对应的色谱图相匹配得到图 4。由“2.5”项可知倒峰处对应时间为酶活性抑制明显的化合物出峰时间。如图 4a 所示,虎杖乙酸乙酯部位提取物的活性谱图中初步识别到 16 个活性负峰,且出峰时间主要集中在前 30 min, 1 号~9 号活性负峰的峰形提示该时间段内存在多个共流出成分,故后续主要围绕前 30 min 开展研究,并针对 1 号~9 号峰展开进一步的分析。

2.9.2 活性成分分析 通过对虎杖乙酸乙酯层提取物质谱数据的解析,结合相关文献数据的查阅和比较,最终共确认了 28 个潜在的 α-葡萄糖苷酶抑制剂,结构如图 5 所示(补充信息见表 2、3)。

2.9.3 虎杖乙酸乙酯层提取物质谱解析 根据未经制备液相色谱富集的乙酸乙酯部位质谱数据,可获得其结构信息。

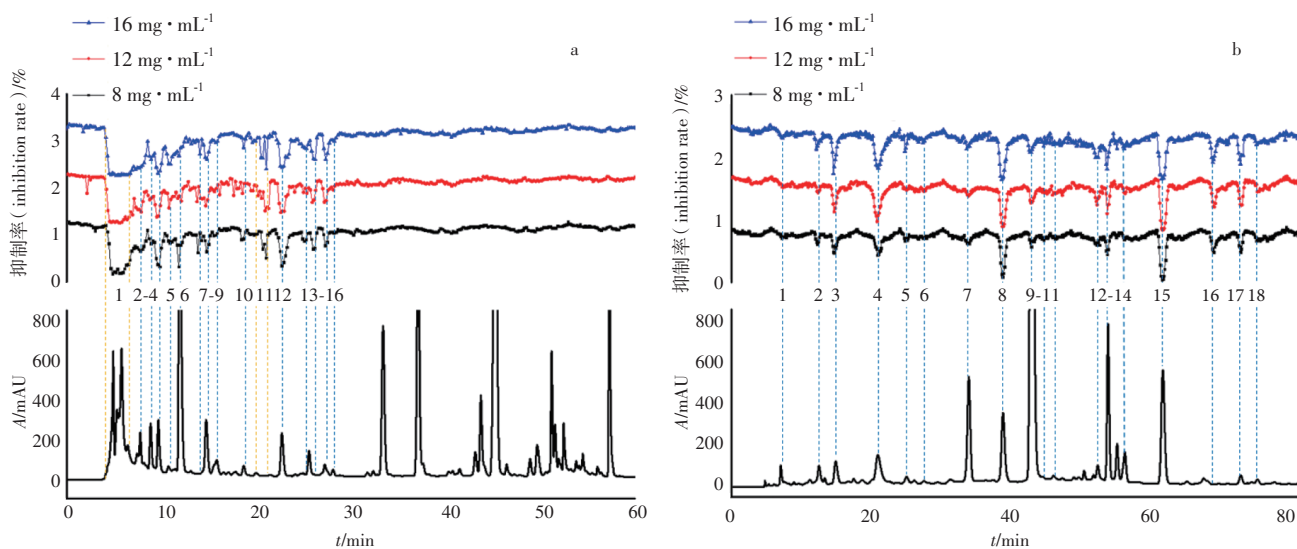


图4 虎杖乙酸酯提取物简化与富集前 (a)、后 (b) 的活性谱图

Fig. 4 Activity profile of ethyl acetate extract before(a) and after(b) the segmented enrichment technique from *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix*

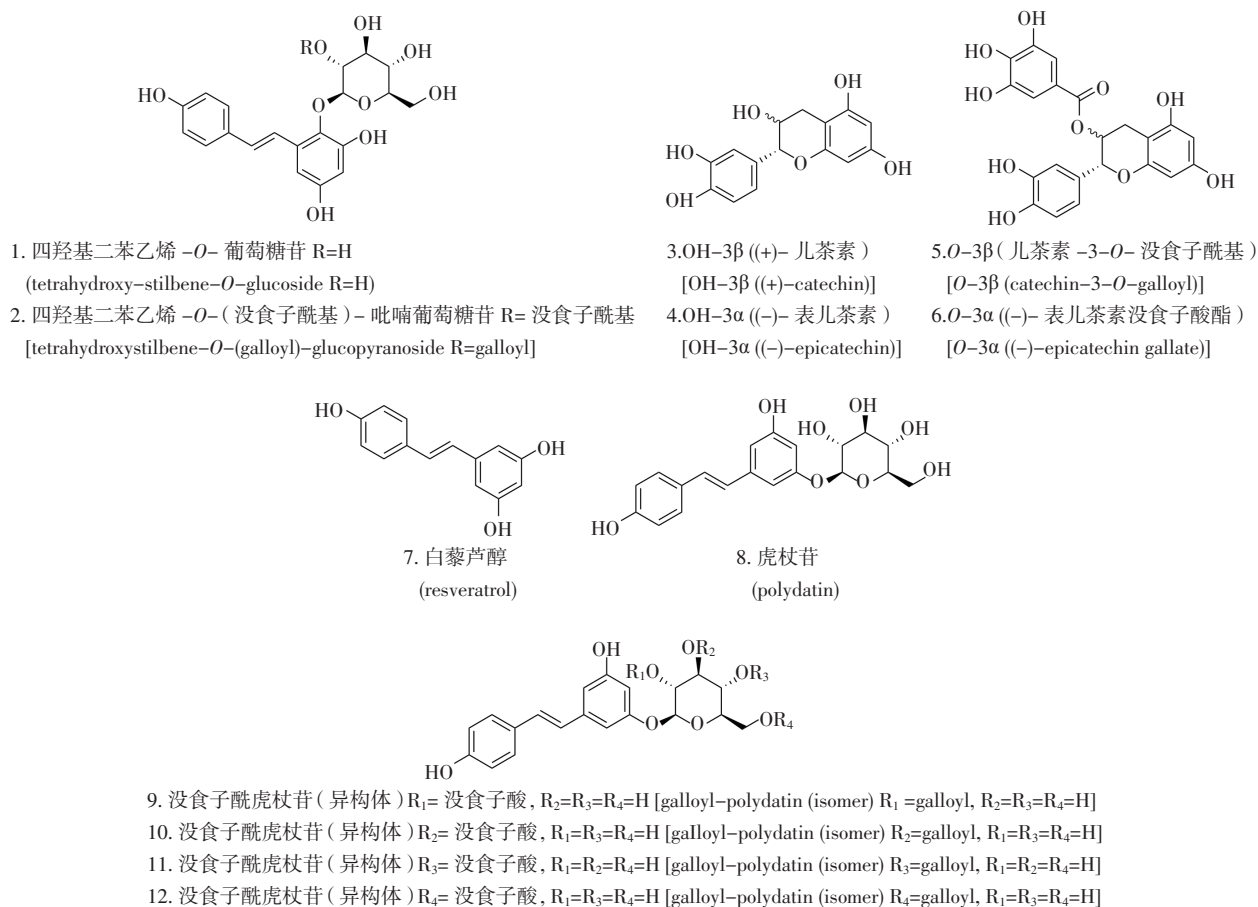
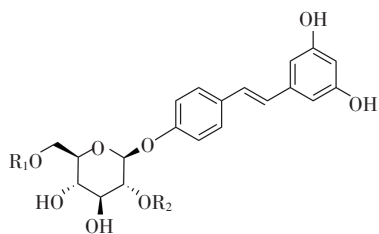


图5 虎杖乙酸酯提取物中活性成分结构

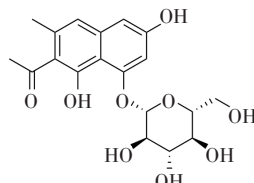
Fig. 5 Structures of active ingredients from *Polygoni Cuspidate Rhizoma et Radix* ethyl acetate extract



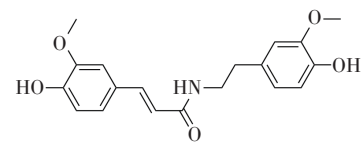
13. 白藜芦醇-4'-O-葡萄糖苷 $R_1=R_2=H$
[resveratrol-4'-O-glucoside $R_1=R_2=H$]

14. 白藜芦醇-4'-O-(6"-没食子酰基)葡萄糖苷 $R_1=$ 没食子酰基, $R_2=H$
[resveratrol-4'-O-(6"-galloyl)glucoside $R_1=$ galloyl, $R_2=H$]

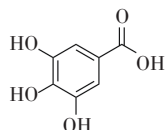
15. 白藜芦醇-4'-O-(2"-没食子酰基)葡萄糖苷 $R_1=H, R_2=$ 没食子酰基
[resveratrol-4'-O-(2"-galloyl)glucoside $R_1=H, R_2=$ galloyl]



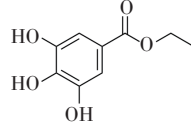
16. 羟基羊蹄根素-O-己糖苷(异构体)
[hydroxymusizin-O-hexoside (isomer)]



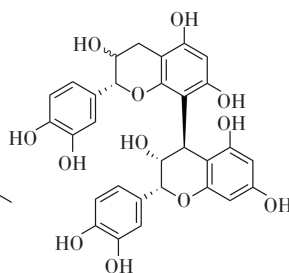
17. 反式-N-阿魏酰-3-O-甲氧基酪胺
(*trans*-*N*-feruloyl-3-O-methyldopamine)



18. 没食子酸
(gallic acid)

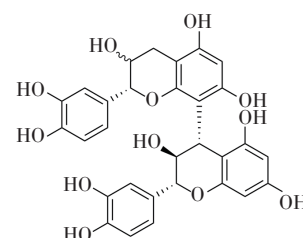


19. 没食子酸乙酯
(ethyl gallate)



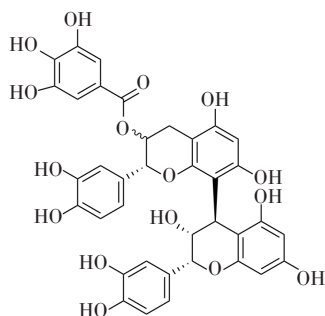
20. OH-3'β(原花青素 B₁)
[OH-3'β (procyanidin B₁)]

21. OH-3'α(原花青素 B₂)
[OH-3'α (procyanidin B₂)]



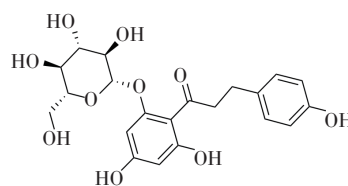
22. OH-3'β(原花青素 B₃)
[OH-3'β (procyanidin B₃)]

23. OH-3'α(原花青素 B₄)
[OH-3'α (procyanidin B₄)]

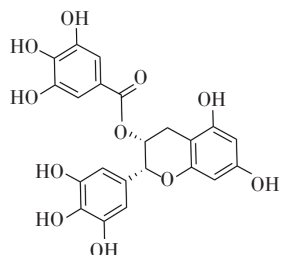


24. OH-3'β(原花青素 B₁-O-没食子酸酯)
[OH-3'β (procyanidin B₁-O-gallate)]

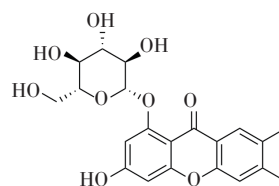
25. OH-3'α(原花青素 B₂-O-没食子酸酯)
[OH-3'α (procyanidin B₂-O-gallate)]



26. 根皮苷
(phlorizin)



27. 表没食子儿茶素没食子酸酯
(epigallocatechin gallate)



28. 何首乌乙素 B
(polygonimitin B)

图 5(续)

Fig. 5 (continued)

峰 2-2 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 405.006 5, 结合文献报道^[18], 其二级质谱显示, 由于氧苷键断裂而失去己糖部分, 形成子离子的 m/z 为 243, 但羟基和氧苷键具体连接位置有待确认, 故峰 2-2 鉴定为四羟基二苯乙烯 $-O-$ 葡萄糖苷 (异构体)^[18]。

峰 6 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 226.964 4, 结合文献报道^[19], 该化合物经二级裂解初步失去 C_2H_2O , 形成子离子的 m/z 为 185 的特征离子, 并再次裂解失去 C_2H_2O , 形成子离子的 m/z 为 143 的特征离子, 故峰 6 鉴定为白藜芦醇。

峰 14 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 342.096 3, 根据文献报道^[20], 该化合物可经二级裂解失去 CH_3 , 得到子离子的 m/z 为 327 的离子, 也可裂解失去 $C_9H_8O_3$, 得到子离子的 m/z 为 178 的特征离子, 故峰 14 鉴定为反式 $-N-$ 阿魏酰 $-3-O-$ 甲氧基酰胺, 属酰胺类。

根据经制备液相色谱处理后的质谱数据, 将解析出的化合物进行分类, 主要有以下 7 类:

(1) 单宁类

峰 2-1 在负离子模式下产生准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 289.071 4, 结合文献报道^[21], 该化合物可失去 CO_2 , 产生子离子的 m/z 为 245 的特征碎片离子。峰 6 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 441.082 7, 二级质谱中产生子离子的 m/z 为 289 和 245 的特征离子, 可以推测峰 2-1 和峰 6 分别为儿茶素 (或表儿茶素) 和表儿茶素没食子酸酯 (ECG)。

(2) 芪类

峰 4-1、7-2、8、12-1、12-3、13、14、18 均产生了 m/z 为 227 的特征离子。峰 4-1、峰 7-2 和峰 8 具有相近准分子离子峰 $[M-H]^-$, 所产生母离子的 m/z 为 389。裂解生成碎片离子的 m/z 为 227, 即具有一个六碳糖的氧苷取代基, m/z 为 227 进一步的质谱裂解规律与白藜芦醇相同, 说明峰 4-1、峰 7-2 和峰 8 具有白藜芦醇的母核, 结合文献报道^[18, 22], 推测峰 4-1、峰 7-2 和峰 8 为虎杖苷或白藜芦醇 $-4'-O-$ 葡萄糖苷。峰 12-1、12-3、13、14、18 均具有与虎杖苷和白藜芦醇 $-4'-O-$ 葡萄糖苷相类似的质谱裂解途径。以峰 12-1、13、14 为例, 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 541.13, 二级质谱中观察到 m/z 为 313 和 227 的特征子离子, 对 m/z 313 的子离子进行二级全扫描质谱分析, 产生的主要碎片离子的 m/z 为 169 和 151, 表明葡萄糖单元的某一羟基被没食子酰取代, 因此推测它们为没食子酰虎杖苷 (异构体) 或白藜芦

醇 $-4'-O-$ (没食子酰基) 葡萄糖苷^[22-23]。峰 10 在负离子模式下产生准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 557.126 5, 特征离子的 m/z 为 243、169、313, 根据文献报道^[23], 推测为四羟基二苯乙烯 $-O-$ (没食子酰基) - 吡喃葡萄糖苷 (异构体)。

(3) 氧杂蒽酮类

峰 15 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 417.118 6, 进一步裂解得到 m/z 为 227 和 185 的子离子, 据文献报道^[23], 峰 15 推测为何首乌乙素 B。

(4) 萜生物类

峰 5、16 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 393.068 3, 经二级质谱裂解得到 m/z 为 231、187 和 67 的子离子, 结合文献报道^[18, 21], 峰 5、16 推测为羟基羊蹄根素 $-O-$ 己糖苷 (异构体)。

(5) 苯甲酸及其酯类

峰 1 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 169.012 4, 可裂解失去 CO_2 得到 m/z 为 125 的特征子离子, m/z 为 125 可进一步裂解产生 m/z 为 97、69 的子离子, 与文献报道相符^[21], 峰 1 鉴定为没食子酸。峰 4-2 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 197.091 2, 经二级质谱分析得 m/z 为 124 和 78 的离子, 与文献报道^[24] 相符, 峰 4-2 鉴定为没食子酸乙酯。

(6) 二氢查尔酮类

峰 4-3 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 435.130 1, 可进一步裂解失去 CO 、 H_2O 和一分子中性糖 (相对分子质量为 162) 得到 m/z 为 227 的特征子离子, 结合文献报道^[25], 推测峰 4-3 为根皮苷。

(7) 黄烷醇类

峰 2-2 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 577.024 5, 产生 m/z 为 407、289 的特征子离子, 结合文献报道^[21], 推测其为原花青素 B_1 、原花青素 B_2 、原花青素 B_3 和原花青素 B_4 。峰 3、峰 12-2 在负离子模式下产生准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 729.146 5 和 729.140 6, 其二级质谱裂解产生 m/z 为 577、559、451 的碎片离子, 根据文献报道^[26] 推断为原花青素 $B-O-$ 没食子酸酯 (异构体)。峰 4-4 产生的 m/z 为 169 的特征碎片离子指示没食子酸的去质子化离子, m/z 为 125 的特征碎片离子指示 1, 2, 3- 三羟基苯的离子, 其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 457.074 9, 结合文献报道^[27], 鉴定峰 4-4 为表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)。

2.9.4 虎杖中活性化合物初步评价 本研究为了验证活性负峰初步指认的化合物抑制活性, 对筛选得到

的部分化合物和市售降糖药对照品进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定。

分别称取儿茶素-3-O-没食子酰基、根皮苷、虎杖苷、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-葡萄糖苷、原花青素 B₂-3''-O-没食子酸酯阳性对照品固体粉末适量于 EP 管中,用 DMSO 配制成初始浓度为 1 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阳性对照品溶液,并按照阳性对照品溶液-DMSO(1:3)的稀释比采用 DMSO 进行连续稀释,使阳性对照品溶液浓度分别为 0.008、0.03、0.08、0.23、0.69、2.1、6.2、18.5、55.6、166.7、500、1 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,依次移取 50 μL 的阳性对照品溶液于 Source 板中,并用 Echo 550 声波加样装置移取阳性对照品溶液 200 nL 至 384 微孔板中。使用电动多通道移液器将 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 α -葡萄糖苷酶溶液(用磷酸盐缓冲液配制, pH 6.8) 12 μL 加到 384 微孔板活性测试的各孔内, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,振荡孵育 5 min。孵育完成后,再将 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pNPG 底物溶液(用磷酸盐缓冲液配制, pH 6.8) 8 μL 加至活性测试的各孔中(终浓度为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min,绘制 60 min 内酶促反应曲线(发射波长为 405 nm)。计算各浓度下阳性化合物的抑制率,使用 Origin 对量效关系进行拟合,得到 α -葡萄糖苷酶溶液对各阳性化合物的 IC₅₀。结果如表 2、3 所示。

表 2 筛出化合物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Tab. 2 α -glucosidase inhibitory activity of screened compounds

编号 (number)	化合物 (compound)	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	儿茶素-3-O-没食子酰基 (catechin-3-O-galloyl)	9.49 \pm 1.93
2	根皮苷 (phlorizin)	93.40 \pm 9.27
3	虎杖苷 (polydatin)	195.37
4	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-葡萄糖苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-glucoside)	213.19 \pm 12.23
5	原花青素 B ₂ -3''-O-没食子酸酯 (procyanidin B ₂ -3''-O-gallate)	69.94 \pm 8.14

3 分析与讨论

3.1 虎杖乙酸乙酯部位活性评价

如图 4-a 所示,针对活性成分共洗脱的问题,通过对前 16 min 流出的流分进行半制备型高效液相色谱分离,进一步提高了色谱峰的分辨率,实现了分析

表 3 市售降糖药标对照的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Tab. 3 α -glucosidase inhibitory activity of reference substances of commercially available antidiabetic drugs

编号 (number)	化合物 (compound)	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	槲皮素 (quercetin)	2.23 \pm 0.29
2	阿卡波糖 (acarbose)	121.74 \pm 18.89
3	阿卡波糖水合物 (acarbose hydrate)	70.87 \pm 12.15
4	米格列醇 (miglitol)	70.18 \pm 4.70

样品的简化与富集。结果如图 4-b 所示,在活性谱图展示的 18 个抑制活性成分中,2 号、3 号、4 号、8 号、9 号、12 号、13 号、15 号、16 号、17 号对应的活性负峰明显,提示其对应的化合物可能是活性较强的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

3.2 虎杖中活性化合物初步评价

根据表 4 可知,儿茶素-3-O-没食子酰基具有 μmol 级别的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。儿茶素-3-O-没食子酰基和原花青素 B₂-3''-O-没食子酸酯均具有黄烷醇或形成酯基的黄烷醇骨架,该骨架可能与 α -葡萄糖苷酶有强亲和力,优先与酶结合,使其无法催化底物而发挥降糖效果。本研究中虎杖苷的抑制活性优于 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-葡萄糖苷,但二者均具有二苯乙烯骨架结构,由于糖环结合位置不同形成结构差异,故猜测糖环连接在苯环间二羟基上可能增强 α -葡萄糖苷酶抑制活性。根皮苷在结构上类似二苯乙烯类化合物,能发生二苯乙烯类化合物与 α -葡萄糖苷酶之间的相互作用,故抑制活性较优。

根据表 4、5 可知,儿茶素-3-O-没食子酰基和原花青素 B₂-3''-O-没食子酸酯的 α -葡萄糖苷酶抑制活性均优于 3 种市售 α -葡萄糖苷酶抑制剂(阿卡波糖、阿卡波糖水合物和米格列醇),具备开发成上市产品的潜力。儿茶素-3-O-没食子酰基与中药强阳性抑制剂槲皮素的抑制活性处于同数量级,两者均具有黄酮类化合物及其衍生物的骨架,提示与 α -葡萄糖苷酶结合位点发生强相互作用的化合物可能有黄酮类及其衍生物的骨架。

本研究通过对虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选,发现部分具有黄烷醇或二苯乙烯结构的化合物

具有较好的抑制活性,提示此类化合物可能具有的降糖潜力,也为中药中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的构效研究提供了数据支撑。

4 结论

本研究将制备液相色谱分段富集技术引入高通量活性轮廓分析平台,实现了虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的高分辨筛选,并通过质谱对获得的 28 个 α -葡萄糖苷酶抑制剂进行结构鉴定,分别为四羟基二苯乙烯-O-葡萄糖苷、(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、儿茶素-3-O-没食子酰基、白藜芦醇、没食子酰虎杖苷(4种异构体)、羟基羊蹄根素-O-己糖苷(异构体)、反式-N-阿魏酰-3-O-甲氧基酰胺、没食子酸、原花青素 B₁、原花青素 B₂、原花青素 B₃、原花青素 B₄、原花青素 B1-O-没食子酸酯(异构体)、原花青素 B2-O-没食子酸酯(异构体)、虎杖苷、没食子酸乙酯、根皮苷、EGCG、(-)-表儿茶素没食子酸酯、四羟基二苯乙烯-O-(没食子酰基)-吡喃葡萄糖苷(异构体)、何首乌乙素 B、白藜芦醇-4'-O-葡萄糖苷、白藜芦醇-4'-O-(6''-没食子酰基)葡萄糖苷、白藜芦醇-4'-O-(2''-没食子酰基)葡萄糖苷。该平台具有的高分辨和高通量特性,使其在中药活性成分筛选和发现过程中展现出极大潜力和价值,可跨越式地推动中药作用机制的发现和成药性研究的效率,助力中药在国际药品市场上竞争力的快速提升。

参考文献

- [1] ROSENGREN A, DIKAIU P. Cardiovascular outcomes in type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2023, 66(3): 425
- [2] MA RC. Epidemiology of diabetes and diabetic complications in China [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(6): 1249
- [3] KASHTOH H, BAEK KH. Recent updates on phytoconstituent alpha-glucosidase inhibitors: an approach towards the treatment of type two diabetes [J]. *Plants(Basel)*, 2022, 11(20): 2722
- [4] DIRIR AM, DAOU M, YOUSEF AF, et al. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes [J]. *Phytochem Rev*, 2022, 21(4): 1049
- [5] PARK G, JUNG H, HEO SJ, et al. Comparison of data mining methods for the signal detection of adverse drug events with a hierarchical structure in postmarketing surveillance [J]. *Life(Basel)*, 2020, 10(8): 138
- [6] 杨丽华,吕维斌. 养阴降糖片干预糖尿病前期患者 60 例临床观察 [J]. *云南中医中药杂志*, 2014, 35(7): 49
YANG LY, LÜ WB. Clinical observation on the intervention of Yangyin Jiangtang tablets on 60 patients with pre-diabetes [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med*, 2014, 35(7): 49
- [7] 赵宏宇,王玉,刘新宇,等. 虎杖提取物对 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响 [J]. *中药材*, 2016, 39(7): 1647
ZHAO HY, WANG Y, LIU XY, et al. Effects of *Polygonum cuspidatum* extract on blood glucose and blood lipids in type 2 diabetic rats [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(7): 1647
- [8] SHENG ZW, AI BL, ZHENG LL, et al. Capability of *Polygonum cuspidatum* extract in inhibiting AGEs and preventing diabetes [J]. *Food Sci Nutr*, 2019, 7(6): 2006
- [9] JIAN JY, CHEN HH, HONG QS, et al. Advances in chromatography-based methods for screening active compounds from natural products [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020: 1504
- [10] WEI H, ZHANG XJ, TIAN X, et al. Pharmaceutical applications of affinity-ultrafiltration mass spectrometry: recent advances and future prospects [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 444
- [11] 简敬一,陈辉煌,洪其生,等. 基于液相色谱分离的天然产物药物活性成分筛选技术研究进展 [J]. *药科学报*, 2020, 55(7): 1504
JIAN JY, CHEN HH, HONG QS, et al. Advances in chromatography-based methods for screening active compounds from natural products [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(7): 1504
- [12] ZHUO RJ, LIU H, LIU NN, et al. Ligand fishing: a remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products [J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1516
- [13] MLADIC M, ZIETEK BM, IYER JK, et al. At-line nanofractionation with parallel mass spectrometry and bioactivity assessment for the rapid screening of thrombin and factor Xa inhibitors in snake venoms [J]. *Toxicon*, 2016, 110: 79
- [14] JIAN JY, YUAN JM, FAN Y, et al. High-resolution bioassay profiling with complemented sensitivity and resolution for pancreatic lipase inhibitor screening [J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 6923
- [15] CHEN ZX, WANG JC, YUAN JM, et al. Rapid screening of neuraminidase inhibitors using an at-line nanofractionation platform involving parallel oseltamivir-sensitive/resistant neuraminidase bioassays [J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1687: 463693
- [16] WANG JC, HUANG XL, MEI J, et al. Screening of trypsin inhibitors in *Cotinus coggygia* Scop. extract using at-line nanofractionation coupled with semi-preparative reverse-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2023, 1691: 463817
- [17] 郝玲玲. 基于近线高分辨活性轮廓分析平台的酶抑制剂筛选研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2022
XI LL. Screening of Enzyme Inhibitors Based on at-line High-Resolution Bioassay Profiling Platform [D]. Guangzhou: Jinan University, 2022
- [18] QIU XH, ZHANG J, HUANG ZH, et al. Profiling of phenolic constituents in *Polygonum multiflorum* Thunb. by combination of ultra-high-pressure liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1292: 121
- [19] 杨冬,刘舒,宋凤瑞,等. 虎杖和大黄中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的超滤质谱研究 [J]. *分析化学*, 2014, 42(4): 552
YANG D, LIU S, SONG FR, et al. Screening of α -glucosidase

- inhibitors from *Polygoni Cuspidati Rhizoma* et *Radix* and *Rhei Radix* et *Rhizoma* using ultrafiltration LC-ESI-MSⁿ [J]. *Anal Chem*, 2014, 42(4): 552
- [20] WANG SY, SUN XZ, AN S, *et al.* High-throughput identification of organic compounds from *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (Zhiheshouwu) by UHPLC-Q-exactive orbitrap-MS [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3977
- [21] JI L, SHI WJ, WANG LT, *et al.* Characterization of the chemical constituents and metabolic profile of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. in rat plasma, urine, and feces by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-exactive Orbitrap mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(23): 4292
- [22] YU M, CHEN TT, ZHANG T, *et al.* Anti-inflammatory constituents in the root and rhizome of *Polygonum cuspidatum* by UPLC-PDA-QTOF/MS and lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195: 113839
- [23] WANG LL, SANG MM, LIU EW, *et al.* Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 45
- [24] BATAGLION GA, DA SILVA FMA, EBERLIN MN, *et al.* Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2015, 180: 280
- [25] LIANG L, XU J, ZHOU WW, *et al.* Integrating targeted and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 934
- [26] XU HR, QU JM, WANG J, *et al.* Discovery of pulmonary fibrosis inhibitor targeting TGF- β RI in *Polygonum cuspidatum* by high resolution mass spectrometry with in silico strategy [J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12(6): 860
- [27] MIZOOKU Y, YOSHIKAWA M, TSUNEYOSHI T, *et al.* Analysis of oxidized epigallocatechin gallate by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(16): 1915

(本文于2024年6月17日收到)